

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-100400

(43)Date of publication of application : 13.04.1999

(51)Int.Cl.

C07K 14/715
A61K 38/00
A61K 39/395
C07K 1/14
C07K 16/28
C12N 5/10
C12P 21/08
G01N 33/53
G01N 33/577
// C07K 14/54
C12N 15/02
(C12N 5/10
C12R 1:91)
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 09-366674

(71)Applicant : HAYASHIBARA BIOCHEM LAB INC

(22)Date of filing : 26.12.1997

(72)Inventor : TORIGOE KAKUJI
USHIO SHINPEI
KUNIKATA TOSHIO
KURIMOTO MASASHI

(30)Priority

Priority number : 08356426	Priority date : 26.12.1996	Priority country : JP
09 52526	21.02.1997	
09163490	06.06.1997	JP
09215490	28.07.1997	JP
		JP

(54) INTERLEUKIN-18 RECEPTOR PROTEIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide the subject new protein composed of an interleukin-18 receptor protein recognizing interleukin-18, capable of suppressing and controlling immune reactions and useful e.g. for the treatment and prevention of diseases caused by excessive immune reaction.

SOLUTION: This new interleukin-18 receptor protein recognizes interleukin-18 and has a property to suppress and control immune reactions in mammals including human and is useful e.g. for mitigating the rejection reaction in organ transplantation, treating and preventing various diseases caused by excessive immune reaction, investigating the physiological action of interleukin-18 and establishing a hybridoma capable of producing a monoclonal- antibody having specificity to interleukin-18 receptor protein. The protein can be produced by culturing human lymphoblast-like cell line L428

cell (FERM BP-5777), disintegrating the cell by the application of ultrasonic wave to the cultured product and collecting the objective protein from the cultured liquid containing the disintegrated cell using a monoclonal antibody having specificity to interleukin-18 receptor protein.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 04.12.2003
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-100400

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月13日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 0 7 K 14/715		C 0 7 K 14/715	
A 6 1 K 38/00	A B B	A 6 1 K 39/395	N
	39/395	C 0 7 K 1/14	
C 0 7 K 1/14		16/28	
16/28		C 1 2 P 21/08	Z N A
審査請求 未請求 請求項の数28 F D (全 23 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-366674	(71) 出願人	000155908 株式会社林原生物化学研究所 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
(22) 出願日	平成9年(1997)12月26日	(72) 発明者	鳥越 角二 岡山県倉敷市藤戸町藤戸1343番地の5
(31) 優先権主張番号	特願平8-356426	(72) 発明者	牛尾 真平 岡山県岡山市山崎278番地の25
(32) 優先日	平8(1996)12月26日	(72) 発明者	國方 敏夫 岡山県岡山市神田町2丁目8番49号
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	栗本 雅司 岡山県岡山市学南町2丁目7番25号
(31) 優先権主張番号	特願平9-52526		
(32) 優先日	平9(1997)2月21日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
(31) 優先権主張番号	特願平9-163490		
(32) 優先日	平9(1997)6月6日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 インターロイキン-18受容体蛋白質

(57) 【要約】

【課題】 インターロイキン-18を認識する受容体及びその受容体に特異的なモノクローナル抗体並びにそれらの用途を提供することを課題とする。

【解決手段】 インターロイキン-18を認識する受容体蛋白質、その受容体蛋白質を有効成分として含んでなる感受性疾患剤、該受容体蛋白質に特異的なモノクローナル抗体、そのモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマ、同モノクローナル抗体を用いるインターロイキン-18受容体蛋白質の精製方法及び検出方法、有効成分として同モノクローナル抗体を含んでなるインターロイキン-18に対する阻害剤、同モノクローナル抗体をインターロイキン18受容体蛋白質に作用させることを特徴とするインターロイキン-18の阻害方法、有効成分として同受容体蛋白質を含んでなるインターロイキン-18に対する中和剤、そして、インターロイキン-18に同受容体蛋白質を作用させることを特徴とするインターロイキン-18の中和方法により解決する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インターロイキン-18を認識するインターロイキン-18受容体蛋白質。

【請求項2】 ヒト又はマウスに由来する請求項1に記載のインターロイキン-18受容体蛋白質。

【請求項3】 ヒトリンパ芽球様細胞に由来する請求項1又は2に記載のインターロイキン-18受容体蛋白質。

【請求項4】 ヒトリンパ芽球様細胞がL428細胞（FERM BP-5777）である請求項3に記載の10 インターロイキン-18受容体蛋白質。

【請求項5】 インターロイキン-18が配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列（ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表すものとする。）、又は、配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列（ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、メチオニン又はトレオニンを表すものとする。）を有する請求項1、2、3又は4に記載のインターロイキン-18受容体蛋白質。

【請求項6】 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリル20 アミドゲル電気泳動において分子量30,000乃至180,000ダルトンを示す請求項1、2、3、4又は5に記載のインターロイキン-18受容体蛋白質。

【請求項7】 部分アミノ酸配列として、配列表における配列番号3乃至10に示すアミノ酸配列の1又は複数20 を有する請求項1、2、3、4、5又は6に記載のインターロイキン-18受容体蛋白質。

【請求項8】 有効成分としてインターロイキン-18受容体蛋白質を含んでなる感受性疾患剤。

【請求項9】 安定剤として血清アルブミン、ゼラチン、糖質及び／又は緩衝剤を含んでなる請求項8に記載の感受性疾患剤。30

【請求項10】 抗自己免疫疾患剤としての請求項8又は9に記載の感受性疾患剤。

【請求項11】 免疫抑制剤としての請求項8又は9に記載の感受性疾患剤。

【請求項12】 インターロイキン-18受容体蛋白質に特異的なモノクローナル抗体。

【請求項13】 重鎖及び軽鎖の変領域が、それぞれ、配列表における配列番号11及び12に示すアミノ酸配列を含有する請求項12に記載のモノクローナル抗体。40

【請求項14】 重鎖及び軽鎖の変領域における相補性決定部位が、それぞれ、配列表における配列番号13乃至15及び配列番号16乃至18に示すアミノ酸配列を含有する請求項12又は13に記載のモノクローナル抗体。

【請求項15】 ヒト化抗体である請求項12、13又は14に記載のモノクローナル抗体。

【請求項16】 インターロイキン-18受容体蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を産生し得るハイブリド50

マ。

【請求項17】 インターロイキン-18受容体蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドマを生体外又は生体内で培養する工程と、その培養物又は体液からモノクローナル抗体を採取する工程を含んでなるモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項18】 培養物又は体液からモノクローナル抗体を塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び／又は等電点電気泳動により採取する請求項17に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項19】 インターロイキン-18受容体蛋白質に特異的なモノクローナル抗体をインターロイキン-18受容体蛋白質と夾雑物質を含む混合物に接触させてモノクローナル抗体にインターロイキン-18受容体蛋白質を吸着せしめる工程と、吸着したインターロイキン-18受容体蛋白質をモノクローナル抗体から脱着させ、採取する工程を含んでなるインターロイキン-18受容体蛋白質の精製方法。

【請求項20】 モノクローナル抗体が水不溶性担体に結合している請求項19に記載のインターロイキン-18受容体蛋白質の精製方法。

【請求項21】 インターロイキン-18受容体蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を被検試料に接触せしめ、免疫反応によりインターロイキン-18受容体蛋白質を検出するインターロイキン-18受容体蛋白質の検出方法。30

【請求項22】 モノクローナル抗体が放射性物質、酵素及び／又は蛍光物質により標識されている請求項21に記載のインターロイキン-18受容体蛋白質の検出方法。

【請求項23】 インターロイキン-18受容体蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を含むインターロイキン-18受容体蛋白質の検出試薬。

【請求項24】 モノクローナル抗体が放射性物質、酵素及び／又は蛍光物質により標識されている請求項23に記載のインターロイキン-18受容体蛋白質の検出試薬。

【請求項25】 有効成分としてインターロイキン-18受容体蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を含んでなるインターロイキン-18に対する阻害剤。

【請求項26】 インターロイキン-18受容体蛋白質に特異的なモノクローナル抗体をインターロイキン-18受容体蛋白質に作用させることを特徴とするインターロイキン-18の阻害方法。

【請求項27】 有効成分としてインターロイキン-18受容体蛋白質を含んでなるインターロイキン-18に対

する中和剤

【請求項28】インターロイキン-18にインターロイキン-18受容体蛋白質を作用させることを特徴とするインターロイキン-18の中和方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明はサイトカインを認識する新規な受容体蛋白質に関するものであり、詳細には、インターロイキン-18を認識する受容体（以下、「IL-18R」と略記する。）を構成する蛋白質、すなわち、IL-18R蛋白質と、IL-18R蛋白質に特異的なモノクローナル抗体に関するものである。

【0002】

【従来の技術】インターロイキン-18（以下、「IL-18」と略記する。）は、免疫系における情報伝達物質であるサイトカインの一種である。IL-18は、特開平8-27189号公報、特開平8-193098号公報及びハルキ・オカムラら「ネイチャー」、第378巻、第6、552号、88乃至91頁（1995年）に見られるように、発見当初、インターフェロン-γ誘導因子として記載されていたが、その後、シンペイ・ウシオら「ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー」、第156巻、4、274乃至4、279頁（1996年）における提案にしたがって、「IL-18」と呼称されるようになった。成熟型のIL-18は157個のアミノ酸からなり、免疫担当細胞において生理活性物質として有用なインターフェロン-γ（以下、「IFN-γ」と略記する。）の産生を誘導する性質と、キラー細胞の細胞障害性を増強したり、キラー細胞の生成を誘導する性質を兼備している。これらの性質故に、IL-18は抗ウイルス剤、抗菌剤、抗腫瘍剤、抗免疫疾患剤などの医薬品として広範な用途が期待され、鋭意研究が進められている。

【0003】前述のとおり、IL-18にかぎらず、サイトカインは、本来、免疫系における情報伝達を担う物質として産生され、分泌される。したがって、サイトカインが哺乳類の体内で過剰に産生されたり、外部から過剰に投与されたりすると、免疫系のバランスに片寄りを生じる可能性がある。哺乳類の細胞の表面には、通常、受容体と呼ばれるサイトカインを認識する部位があり、分泌されたサイトカインは、この受容体に結合することによって、初めて所期の情報を細胞に伝達することができる。正常な免疫系においては、サイトカインとサイトカインを認識する受容体がある一定のバランスを保っていると考えられる。したがって、斯界においては、IL-18を医薬品として実用化するためにも、IL-18そのものの生理作用の解明に加えて、IL-18R蛋白質の性質・性状が一刻も早く解明され、量産されることが期待されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】斯かる状況に鑑み、この発明の第一の課題は、IL-18を認識する受容体を提供することにある。

【0005】さらに、この発明の第二の課題は、斯かる受容体の医薬としての用途を提供することにある。

【0006】加えて、この発明の第三の課題は、斯かる受容体に対するモノクローナル抗体を提供することにある。

【0007】さらに加えて、この発明の第四の課題は、斯かるモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを提供することにある。

【0008】さらに加えて、この発明の第五の課題は、斯かるモノクローナル抗体の製造方法を提供することにある。

【0009】さらに加えて、この発明の第六の課題は、斯かるモノクローナル抗体を用いてIL-18を認識する受容体を精製する方法を提供することにある。

【0010】さらに加えて、この発明の第七の課題は、斯かるモノクローナル抗体を用いてIL-18を認識する受容体を検出する方法を提供することにある。

【0011】さらに加えて、この発明の第八の課題は、斯かるモノクローナル抗体を用いてIL-18を認識する受容体を検出するための試薬を提供することにある。

【0012】さらに加えて、この発明の第九の課題は、斯かるモノクローナル抗体を用いるIL-18に対する阻害剤を提供することにある。

【0013】さらに加えて、この発明の第十の課題は、斯かるモノクローナル抗体によるIL-18の阻害方法を提供することにある。

【0014】さらに加えて、この発明の第十一の課題は、IL-18を認識する受容体を用いるIL-18に対する中和剤を提供することにある。

【0015】さらに加えて、この発明の第十二の課題は、IL-18を認識する受容体を用いてIL-18を中和するIL-18の中和方法を提供することにある。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明者がこれらの課題を解決すべく鋭意研究したところ、ホジキン病患者に由来するリンパ芽球様細胞の一種であるL428細胞中にIL-18を認識する物質が存在していることを突き止めた。本発明者がこの物質を分離し、性質・性状を調べたところ、その本質は蛋白質であり、分離された状態においてもIL-18をよく認識し、結合することが判明した。斯くして存在が確認されたIL-18R蛋白質は、ヒトを含む哺乳類において、免疫系を活性化するIL-18を認識・結合し、自己免疫疾患を始めとする過剰な免疫反応に起因する種々の疾患の治療・予防に効果を発揮することが判明した。さらに、このIL-18R蛋白質を抗原に用いてIL-18R蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを樹立す

るとともに、その産生するモノクローナル抗体がIL-18 R蛋白質の精製、検出に極めて有用であること、ならびに、当該モノクローナル抗体がIL-18の生理作用を効果的に阻害することを確認してこの発明を完成した。

【0017】すなわち、この発明は前記第一の課題を、IL-18を認識するIL-18 R蛋白質により解決するものである。

【0018】この発明は前記第二の課題を、有効成分としてIL-18 R蛋白質を含んでなる感受性疾患剤により解決するものである。

【0019】この発明は前記第三の課題を、IL-18 R蛋白質に特異的なモノクローナル抗体により解決するものである。

【0020】この発明は前記第四の課題を、斯かるモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドームにより解決するものである。

【0021】この発明は前記第五の課題を、IL-18 R蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドームを生体外又は生体内で培養する工程と、その培養物又は体液からモノクローナル抗体を採取する工程を含んでなるモノクローナル抗体の製造方法により解決するものである。

【0022】この発明は前記第六の課題を、IL-18 R蛋白質に特異的なモノクローナル抗体をIL-18 R蛋白質と夾雑物質を含む混合物に接触せしめてモノクローナル抗体にIL-18 R蛋白質を吸着せしめる工程と、吸着したIL-18 R蛋白質をモノクローナル抗体から脱着させ、採取する工程を含んでなるIL-18 R蛋白質の精製方法により解決するものである。

【0023】この発明は前記第七の課題を、IL-18 R蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を被検試料に接触せしめ、免疫反応によりIL-18 R蛋白質を検出するIL-18 R蛋白質の検出方法により解決するものである。

【0024】この発明は前記第八の課題を、IL-18 R蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を含むIL-18 R蛋白質の検出試薬により解決するものである。

【0025】この発明は前記第九の課題を、有効成分としてIL-18 R蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を含んでなるIL-18に対する阻害剤により解決するものである。

【0026】この発明は前記第十の課題を、IL-18 R蛋白質に特異的なモノクローナル抗体をIL-18 R蛋白質に作用させることを特徴とするIL-18の阻害方法により解決するものである。

【0027】この発明は前記第十一の課題を、有効成分としてIL-18 R蛋白質を含んでなるIL-18に対する中和剤により解決するものである。

【0028】この発明は前記第十二の課題を、IL-1

8にIL-18 R蛋白質を作用させることを特徴とするIL-18の中和方法により解決するものである。なお、この発明で用いるL428細胞は、平成8年12月24日以降、茨城県つくば市東1丁目1番3号にある通商産業省、工業技術院、生命工学工業技術研究所に受託番号「FERM BP-5777」で寄託されている。

【0029】

【発明の実施の形態】以下、この発明の実施の形態につき説明すると、この発明のIL-18 R蛋白質は、IL-18を認識する性質により特徴付けられる。前述のとおり、IL-18は、すでに、ヒト及びマウスに由来するものが知られており、これらはいずれも157個のアミノ酸を含んでなり、それぞれ、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列（ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表すものとする。）、及び、配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列（ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、メチオニン又はトレオニンを表すものとする。）を有する。この発明のIL-18 R蛋白質はIL-18を認識し、結合する部位を有し、免疫担当細胞において、この部位にIL-18が結合すると、IL-18 γ の産生が誘導される。この発明のIL-18 R蛋白質は、100℃で5分間加熱すると、これらの性質を失い、また、IL-18が結合した状態で還元剤存在下のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、「SDS-PAGE」と略記する。）を適用すると、見掛け上、分子量約50,000乃至200,000ダルトンを示す。さらに、この発明のIL-18 R蛋白質は、部分アミノ酸配列として、配列表における配列番号3乃至10に示すアミノ酸配列の1又は複数を有する。

【0030】この発明のIL-18 R蛋白質は、斯かる性質を指標にして、ヒトを含む哺乳類由来の細胞から得ることができる。細胞の具体例としては、上皮細胞、内皮細胞、間質細胞、軟骨細胞、単球、顆粒球、リンパ球、神経細胞及びそれらを培養株化して得られる細胞株であって、IL-18 R蛋白質を発現している細胞が望ましい。とりわけ、リンパ球を含む造血系細胞などを培養株化して得られる、例えば、ジュン・ミノワダ「キャンサー・レビュー」、第10巻、1乃至18頁（1988年）に記載されているJM細胞、HDL-2細胞、MOLT-16細胞及びPEER細胞、さらには、L428細胞（FERM BP-5777）、KG-1細胞（ATCC CCL-246）、U-937細胞（ATCC CRL-1593.2）などのリンパ芽球様細胞株は、増殖させ易く、IL-18 R蛋白質が収量良く得られるので、IL-18 R蛋白質の給源として好適である。これらの細胞からIL-18 R蛋白質を採取するには、細胞の培養物に、例えば、超音波などを印加して細胞を破碎した後、細胞破碎物を含む培養物からIL-1

8を認識する蛋白質の画分を採取する。細胞の培養に当たって、培養培地に上述のごとき哺乳類由来の細胞においてIL-18Rの発現を誘発する物質、とりわけ、IL-12やIL-18を細胞 1×10^6 個当り約0.01pg乃至1 μ g、望ましくは、約1pg乃至100ng含有せしめると、IL-18R蛋白質の収量が著増する。これは造血系細胞において特に顕著であり、例えば、IL-12を共存させると、細胞によってはIL-18R蛋白質の収量が2倍以上にも高まる。IL-18R蛋白質の採取には、生理活性物質を精製するための慣用の方法が採用され、具体的には、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などを単独又は適宜組合せて適用する。とりわけ、IL-18R蛋白質が特異的に認識するIL-18そのもの、あるいは、IL-18R蛋白質に特異的なこの発明のモノクローナル抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィー

によるときには、高純度のIL-18R蛋白質が最少の時間と労力で得られる。

【0031】この発明のIL-18R蛋白質は、ヒトを含む哺乳類において、免疫系を活性化するIL-18を認識・結合して免疫反応を抑制したり調節する性質を有するので、過剰な免疫反応に起因する種々の疾患の治療・予防に著効を発揮する。免疫系は、本来、有害な異物から生体を防御するためのものであるが、ときとして、その働き故に、却って、生体に有害な結果をもたらすことがある。哺乳類に、例えば、皮膚、腎臓、肝臓、心臓、骨髄などの臓器を移植すると、同種異系抗原に対する拒絶反応や免疫反応により、T細胞が活性化され、リンパ球が増殖したり、炎症が生じることがある。症状の程度こそ違え、同様の現象は、例えば、アレルゲンのように、宿主が固有のものと見做さない異種異系抗原が侵入した場合にも観察される。自己免疫疾患においては、本来、固有のものと見做されるべき成分がアレルギー反応を惹起する。この発明のIL-18R蛋白質は、ヒトを含む哺乳類に投与すると、斯かる拒絶反応や免疫反応を抑制又は調節し、それらに起因する各種疾患の治療・

候群、自己免疫性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、重症筋無力症、進行性全身性硬化症、全身性エリテマトーデス、多発性寒冷色素尿症、多発性筋炎、多発性結節性動脈炎、多発性硬化症、特発性アジソン病、特発性血小板減少性紫斑病、バセドウ病、白血球減少症、ベーチェット病、早発性更年期、慢性関節リウマチ、リウマチ熱、慢性甲状腺炎、ホジキン病、HIV感染症、喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、花粉症及びハチ毒アレルギーを含む自己免疫疾患及びアレルギー性疾患が挙げられる。なお、この発明のIL-18R蛋白質は、IFN- γ の過剰産生や過剰投与などに起因する敗血症ショックの治療や予防にも有効である。

【0032】斯くして、有効成分としてIL-18R蛋白質を含んでなるこの発明の感受性疾患剤は、上記のごとき感受性疾患を治療・予防するための抗自己免疫疾患剤、抗アレルギー剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、増血剤、白血球増多剤、血小板増多剤、鎮痛剤、解熱剤などとして多種多様な用途を有することとなる。剤型並びに感受性疾患の種類及び症状にもよるが、この発明の感受性疾患剤は、通常、液状、懸濁状、ペースト状又は固形状に調製され、この発明のIL-18R蛋白質を0.00001乃至100% (w/w)、望ましくは、0.0001乃至20% (w/w) 含んでなる。

【0033】この発明の感受性疾患剤は、IL-18R蛋白質単独の形態はもとより、IL-18R蛋白質とそれ以外の生理的に許容される、例えば、担体、賦形剤、希釈剤、アジュバント、安定剤、さらには、必要に応じて、他の生理活性物質の1若しくは複数種類との組成物としての形態をも包含する。安定剤としては、例えば、血清アルブミンやゼラチンなどの蛋白質、グルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ソルビトール、マルチトール、マンニトール、ラクチトールなどの糖質及びクエン酸塩若しくは磷酸塩を主体とする緩衝剤が、また、併用し得る他の生理活性物質としては、例えば、FK506、グルココルチコイド、シクロフォスファミド、ナイトロゲンマスタード、トリエチレンチオフォスファミド、ブズルファン、フェニラミンマスタード、クロランブシル、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、6-アザグアニン、8-アザグアニン、フルオロウラシル、シタラビン、メトトレキサート、アミノプテリン、マイトマイシンC、塩酸ダウノルビシン、アクチノマイシンD、クロモマイシンA3、塩酸ブレオマイシン、塩酸ドキソルビシン、サイクロスポリンA、L-アスバラギナーゼ、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ヒドロキシウレア、塩酸プロカルバジン、副腎皮質ホルモン、金製剤などの他に、IL-18以外のサイトカインの受容体アンタゴニスト、例えば、インターロイキン-1受容体蛋白質、インターロイキン-2受容体蛋白質、インターロイキン-5受容体蛋白質、インターロイキン-6受容体蛋白質、

インターロイキン-8受容体蛋白質及びインターロイキン-12受容体蛋白質に対するそれぞれの抗体、さらには、TNF- α 受容体、TNF- β 受容体、インターロイキン-1受容体、インターロイキン-5受容体及びインターロイキン-8受容体に対するそれぞれのアンタゴニストなどが挙げられる。

【0034】さらに、この発明の感受性疾患剤は、投薬単位形態の薬剤をも包含し、その投薬単位形態の薬剤とは、IL-18R蛋白質を、例えば、1回当りの用量又はその整数倍（4倍まで）若しくはその約数（1/40まで）に相当する量を含んでなり、投薬に適する物理的に一体の剤型にある薬剤を意味する。このような投薬単位形態の薬剤としては、注射剤、液剤、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、舌下剤、点眼剤、点鼻剤、坐剤などが挙げられる。この発明の感受性疾患剤は経口的に投与しても非経口的に投与してもよく、いずれの場合にも、感受性疾患の治療・予防に効果を発揮する。感受性疾患の種類や症状にもよるが、具体的には、患者の症状や投与後の経過を観察しながら、成人当たり約1 μ g乃至1g/回、通常、約10 μ g乃至100mg/回のIL-18R蛋白質を1乃至4回/日又は1乃至5回/週の用量で1日乃至1年間に亘って経口投与するか、皮内、皮下、筋肉内又は静脈内に非経口投与すればよい。

【0035】ところで、この発明はIL-18R蛋白質に特異的なモノクローナル抗体に関するものである。この発明のモノクローナル抗体は、IL-18R蛋白質又はその抗原性フラグメントを抗原として用いることにより得ることができる。具体的には、例えば、斯かる抗原で免疫感作しておいた哺乳動物より採取した抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳類由来の細胞とのハイブリドーマを作製し、これよりこの発明のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマのクローンを選択し、得られたクローンを生体内外で培養することにより得ることができる。抗原としてのIL-18R蛋白質は、通常、完全精製又は部分精製した状態で用いられ、これらは、例えば、前述したIL-18R蛋白質の製造方法によっても得ることができる。抗原性フラグメントを得るには、これらの完全精製品又は部分精製品を化学的又は酵素的に分解するか、ペプチド合成すればよい。また、IL-18R蛋白質を発現している細胞は、そのまま抗原として用いることができる。

【0036】免疫感作は慣用の方法によればよく、例えば、上記のごとき抗原を単独又は適宜アジュバントとともに哺乳動物の静脈、皮内、皮下又は腹腔内に注射接種し、一定期間飼育する。哺乳動物に特に限定はなく、所期の抗体産生細胞が得られるかぎり、種類、大きさ、雌雄は問わない。通常はラット、マウス、ハムスターなどのげっ歯類が用いられ、後記無限増殖可能な哺乳類由来の細胞との適合性も勘案しながら、最適のものが選択される。用いる哺乳動物の種類や大きさにもよるが、抗原

の接種量は、通常、総接種量を約5乃至500 μ g/匹とし、これを約1乃至2週間の間隔を置いて2乃至20回に分けて接種する。そして、最終接種から3乃至5日後に脾臓を摘出し、分散して抗体産生細胞としての脾細胞を得る。

【0037】次に、斯くして得られた抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳類由来の細胞とを融合させて目的のハイブリドーマを含む細胞融合産物を得る。無限増殖可能な哺乳類由来の細胞には、通常、P3/NS1/1-Ag4-1細胞(ATCC TIB-18)、P3X63Ag8細胞(ATCC TIB-9)及びSp2/O-Ag14細胞(ATCC CRL-1581)などのマウス骨髓腫由来の細胞株又はその変異株が用いられる。細胞融合は、例えば、ポリエチレングリコールやセンダイウイルスを始めとする融合促進剤や電気パルスによる慣用の方法が用いられ、一例を挙げると、融合促進剤を含む融合培地に抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳類由来の細胞を約1:1乃至1:10の割合で浮遊させ、この状態のまま約30乃至40℃で約1乃至5分間インキュベートする。融合培地には、例えば、MEM培地、RPMI-1640培地及びイスコフ改変ダルベコ培地を始めとする通常一般のものをを用い得るが、ウシ血清などの血清類は除いておくのが望ましい。

【0038】目的のハイブリドーマを選択するには、先ず、上記のようにして得た細胞融合産物をHAT培地などの選択用培地に移し、約30乃至40℃で約3日乃至3週間培養してハイブリドーマ以外の細胞を死滅させる。次に、ハイブリドーマを常法により培養し、培養物中に分泌された抗体につき、IL-18R蛋白質との結合性を試験する。試験には、例えば、エンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ及びバイオアッセイなどの抗体を検出するための慣用の方法が用いられ、例えば、富山朔二、安東民衛編「単クローナル抗体実験マニュアル」、1991年、講談社サイエンティフィック発行、105乃至152頁にはそのための方法が種々詳述されている。IL-18R蛋白質に特異的な抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈法などにより直ちにクローニングされ、単クローン化されたこの発明のハイブリドーマを得る。

【0039】この発明のモノクローナル抗体は、斯かるハイブリドーマを生体内外で培養することにより得ることができる。培養には、哺乳類由来の細胞を培養するための慣用の方法が用いられ、例えば、生体外の培養培地で培養するときには、その培養物から、一方、ヒト以外の温血動物に移植して生体内で培養するときには、その腹水及び/又は血液からモノクローナル抗体を採取する。後述のハイブリドーマ#117-10Cはこの発明のモノクローナル抗体の産生能が高く、しかも、生体内外における培養が容易であるという特徴がある。培養物又は腹水若しくは血液からモノクローナル抗体を採取す

るには、抗体一般を精製するための斯界における慣用の方法が用いられる。個々の方法としては、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動が挙げられ、これらは必要に応じて組合せて適用される。精製したモノクローナル抗体は、その後、濃縮・乾燥し、用途に応じて液状又は固状とする。

【0040】なお、サイトカインの一種であるインターロイキン-6（以下、「IL-6」と略記する。）は、この発明のモノクローナル抗体の製造に極めて有用である。すなわち、抗原により哺乳動物を免疫感作する際に、抗原接種と同時に又は抗原接種の前後にIL-6を注射投与すると、哺乳動物における抗体価が著しく上昇する。さらに、抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳類由来の細胞を細胞融合させるための融合培地にIL-6を共存させると、細胞融合における抗体陽性率が飛躍的に上昇し、ハイブリドーマのクローニングが極めて容易となり、一方、単一クローン化されたハイブリドーマを増殖させるための培養培地にIL-6を共存させると、ハイブリドーマの増殖が促進され、この発明のモノクローナル抗体の収量が著増する。IL-6としては、それが哺乳動物や無限増殖可能な哺乳類由来の細胞と同一の種に由来するものであれば、天然型であるか組換え型であるかは問わない。

【0041】この発明のモノクローナル抗体は、通常、蛋白質工学の手法によって調製される、いわゆる、「ヒト化抗体」をも包含する。ヒト化抗体を調製するには、例えば、上述のようにして得た哺乳動物由来のハイブリドーマからmRNAを採取し、逆転写酵素を作用させてcDNAとし、PCR反応により増幅した後、クローニングして、この発明のモノクローナル抗体における重鎖及び軽鎖の塩基配列、とりわけ、重鎖及び軽鎖における可変領域の塩基配列をそれぞれ決定する。そして、それらの可変領域とヒト抗体の定常領域を融合させたポリペプチドをコードするキメラ遺伝子を作製する。このキメラ遺伝子は、適宜宿主中で発現させると、元のモノクローナル抗体と同様の結合特異性を示しつつ、ヒトに対する抗原性が顕著に低減したモノクローナル抗体を産生する。

【0042】さらに、その重鎖及び軽鎖における抗原結合部位を構成する「相補性決定部位（CDR）」のアミノ酸配列を解明し、このアミノ酸配列と、必要に応じて、可変領域におけるCDR周辺のアミノ酸数個とともに、元のモノクローナル抗体と同様の三次元構造を有するヒト抗体に移植するときには、ヒト抗体に共通する定常領域と可変領域の枠組構造を有し、本質的にCDRのみが哺乳動物に由来するヒト化抗体を得ることができ

る。ちなみに、後述するこの発明のハイブリドーマ#117-10Cが産生するモノクローナル抗体MAb#117-10Cは、重鎖及び軽鎖の可変領域において、それぞれ配列表における配列番号11及び12に示すアミノ酸配列を含有しており、ハイブリドーマ#117-10Cにおいては、その配列番号11及び12に示すアミノ酸配列は、それぞれ、配列表における配列番号19及び20に示す塩基配列によりコードされている。また、モノクローナル抗体MAb#117-10Cにおいては、配列表における配列番号13乃至15に示すアミノ酸配列が、それぞれ、重鎖における3種類のCDR、すなわち、CDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列に相当し、また、配列表における配列番号16乃至18に示すアミノ酸配列が、それぞれ、軽鎖における3種類CDR、すなわち、CDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列に相当する。なお、哺乳動物由来の抗体をヒト化する方法自体は公知であり、例えば、エス・ポール監修「メソッズ・イン・モレキュラー・バイオロジー」、第51巻、1995年、ヒューマナ・プレス発行には関連する種々の技法が記載されている。

【0043】この発明のモノクローナル抗体は、イムノアフィニティークロマトグラフィーによるIL-18R蛋白質の精製に極めて有用である。斯かる精製方法は、この発明のモノクローナル抗体をIL-18R蛋白質とそれ以外の夾雑蛋白質を始めとする夾雑物質との混合物に接触させてモノクローナル抗体にIL-18R蛋白質を吸着させる工程と、吸着したIL-18R蛋白質をモノクローナル抗体から脱着させ、採取する工程を含んでなり、両工程は、通常、水性媒体中で行なわれる。この発明のモノクローナル抗体は、通常、ゲル状の水不溶性担体に結合した状態で用いられ、その水不溶性担体を円筒管などにカラム状に充填し、これに、例えば、細胞培養液又はその部分精製品を通液すると、実質的にIL-18R蛋白質のみが水不溶性担体上のモノクローナル抗体に吸着する。吸着したIL-18R蛋白質は、モノクローナル抗体周囲の水素イオン濃度を変えることにより、容易に脱着させることができ、例えば、イムノグロブリンGのクラスに属するモノクローナル抗体を用いる場合は酸性側のpH、通常、pH2乃至3で、一方、イムノグロブリンMのクラスに属するモノクローナル抗体を用いる場合はアルカリ側のpH、通常、pH10乃至11で脱着・溶出させる。この発明の精製方法によるときは、IL-18R蛋白質を最少の時間と労力で高度に精製できる。

【0044】この発明のモノクローナル抗体は、IL-18R蛋白質を検出するための試薬としても広範な用途を有する。すなわち、この発明のモノクローナル抗体によるラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイなどの標識イムノアッセイを適用するときには、被検試料中のIL-18R蛋白質を迅

速且つ正確に定性又は定量分析することができる。斯かる標識イムノアッセイにおいて、この発明のモノクローナル抗体は、例えば、放射性物質、酵素及び／又は蛍光物質により標識して用いられる。この発明のモノクローナル抗体はIL-18R蛋白質に特異的に反応し、免疫反応を呈するので、その免疫反応を標識物質を指標に測定すれば、被検試料中のごく微量のIL-18R蛋白質を精度良く検出することができる。標識イムノアッセイは、バイオアッセイと比較して、一度に数多くの被検試料を分析できるうえに、分析に要する時間と労力が少なくすみ、しかも、分析が高精度であるという特徴がある。したがって、この発明による検出方法は、IL-18R蛋白質を製造する際の工程管理や製品の品質管理、さらには、組織や体液におけるIL-18及び／又はIL-18R蛋白質のレベルを指標とする種々の感受性疾患の診断に極めて有用である。この発明はモノクローナル抗体の標識や標識イムノアッセイそのものに係わるものではないので詳細な説明は省くが、例えば、ビー・ティッセン著、石川栄治訳「エンザイムイムノアッセイ」、1989年、東京化学同人発行、196乃至348頁などにはそのための方法が種々詳述されている。

【0045】なお、この発明のモノクローナル抗体は、ヒトを含む哺乳類において、IL-18R蛋白質を発現している細胞へのIL-18の結合に対して拮抗的に働き、IL-18の生理作用を阻害するので、当該モノクローナル抗体をIL-18R蛋白質に作用させるこの発明の阻害剤及び阻害方法は、IL-18が直接又は間接的に関与する、例えば、炎症性疾患、アレルギー性疾患及び自己免疫疾患を初めとする種々の疾患の治療や、臓器移植に伴う拒絶反応や過剰な免疫反応の抑制にも有効である。一方、この発明のIL-18R蛋白質には、IL-18を認識し、結合して、その生理作用を中和する性質があるので、IL-18に当該IL-18R蛋白質を作用させるこの発明の中和剤及び中和方法は、生体内で過剰産生されたIL-18や生体内に過剰投与されたIL-18の中和に有用である。さらに、この発明のIL-18R蛋白質は、IL-18を認識し、結合する性質があるので、当然のことながら、IL-18を精製したり検出するためのアフィニティークロマトグラフィーや標識アッセイにおいて、上記したこの発明のモノクローナル抗体と同様の用途を有する。なお、この発明のIL-18R蛋白質及びモノクローナル抗体並びにそれらの断片は、IL-18Rに対する作動薬や拮抗薬を検索するための試薬としても有用であることを付言しておく。

【0046】以下、実施例に基づきこの発明を説明するが、斯界の技術水準においては、斯かる実施例は多種多様に改変可能である。斯かる技術水準に鑑み、この発明がこれらの実施例のみに限定されるべきでないことは言うまでもない。

【0047】

【実施例1】

〈IL-18R蛋白質の調製〉常法により、生後間もないハムスター新生児の腹腔内にウサギ由来の抗リンパ球抗体を注射して免疫反応を減弱させた後、背部皮下にホジキン病患者に由来するリンパ芽球様細胞株の一種であるL428細胞(FERM BP-5777)を約 5×10^5 個/匹注射移植し、通常の方法で3週間飼育した。皮下に生じた腫瘍塊(約10g/匹)を摘出し、常法により血清無含有のRPMI-1640培地(pH 7.4)により分散させ、洗浄して増殖細胞を得た。

【0048】この増殖細胞に対して0.83%(w/v)塩化アンモニウムと170mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.7)との混液(容量比9:1)を細胞湿重量の10倍量加え、攪拌した後、2,000rpmで10分間遠心分離して細胞を回収した。次に、細胞を適量の磷酸緩衝食塩水(以下、「PBS」と言う。)に浮遊させ、攪拌し、2,000rpmで遠心分離して再度回収し、1mM塩化マグネシウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)に細胞密度約 1×10^6 個/mlになるように浮遊させ、キネマティカ製細胞破碎機「ポリトロン」により破碎し、1mM塩化マグネシウム及び1Mシュクロースをそれぞれ含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)をシュクロースの最終濃度が0.2Mになるように加えた後、1,000rpmで遠心分離して上清を採取し、これを25,000rpmでさらに60分間遠心分離し、沈澱部を採取した。この沈澱に12mM 3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルフォネート(以下、「CHAPS」と言う。)、10mM EDTA及び1mMフェニルメチルスルホンフルオリドをそれぞれ適量加え、4℃で16時間攪拌した後、25,000rpmで60分間遠心分離し、上清を採取した。

【0049】この上清を12mM CHAPSを含むPBSにより平衡化しておいたファルマシア製アフィニティークロマトグラフィー用ゲル「ウィート・ジャーム・レクチン・セファロース6B」のカラムに負荷し、カラムを12mM CHAPSを含むPBSにより洗浄した後、溶出液の蛋白質含量を波長280nmの紫外線に対する吸光度でモニターしながら、0.5M N-アセチル-D-グルコサミン及び12mM CHAPSをそれぞれ含むPBSを通液した。そして、吸光度が0.16乃至0.20の画分を採取し、合一したところ、蛋白質含量約1mg/mlの水溶液が原料細胞 10^{12} 個当たり約25l得られた。

【0050】この水溶液の一部を小分し、常法にしたがって 125 Iで標識したヒトIL-18を4ngずつ加え、4℃で1時間インキュベートし、担体としてγ-グロブリンと平均分子量6,000ダルトンのメルク製ポリエチレングリコール「ポリエチレングリコール600

0」をそれぞれ適量加え、氷冷下で30分間静置して結合反応させた後、反応物を6,000rpmで5分間遠心分離し、生じた沈澱を採取し、放射能強度を測定した。同時に、 125 I標識ヒトIL-18に加えて未標識のヒトIL-18を3 μ g用いる系を設け、これを上記と同様に処置して対照とした。対照と比較したところ、被検水溶液から生じた沈澱の放射能強度は有意に高かった。このことは、上記で得た水溶液が正にIL-18R蛋白質を含有するものであり、IL-18に作用させると、このIL-18R蛋白質がIL-18を認識し、結合したことを示している。

【0051】

【実施例2】

〈ハイブリドーマ#117-10Cの調製〉常法にしたがって、BALB/cマウスの腹腔内にL428細胞(FERMBP-5777)を 5×10^7 個/匹/回の接種量で6箇月間に13回注射してマウスを免疫感作した。脾臓摘出の6日前と3日前に、マウスの腹腔内に実施例1の方法により得たIL-18R蛋白質を1 μ g/匹それぞれ注射接種し、最後の接種から3日目にマウスから脾臓を摘出し、分散させて抗体産生細胞としての脾細胞を得た。

【0052】この脾細胞とマウス骨髓腫由来のSp2/O-Ag14細胞(ATCC CRL-1581)を37℃に予温しておいた血清無含有のRPMI-1640培地(pH7.2)にそれぞれ 3×10^4 個/ml及び 1×10^4 個/mlになるように浮遊させ、遠心分離した後、沈澱部を採取した。この沈澱に平均分子量1,500ダルトンの50%(w/v)ポリエチレングリコールを含む血清無含有のRPMI-1640培地(pH7.2)1mlを1分間かけて滴々加え、37℃で1分間インキュベートし、全量が50mlになるまで血清無含有のRPMI-1640培地(pH7.2)を滴々加え、遠心分離した後、沈澱部を採取した。この沈澱をHAT培地に浮遊させ、96ウェルマイクロプレートに200 μ l/ウェルずつ分注し、37℃で1週間インキュベートして約1,200種類のハイブリドーマを得た。これらのハイブリドーマの培養上清に後記実施例3-2(a)で述べる2種類の結合試験法をそれぞれ適用し、IL-18のIL-18R蛋白質及びL428細胞への結合を顕著に阻害する培養上清を与えたハイブリドーマを選別し、これに通常の限界希釈法を繰返し適用し、この発明のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマのクローン#117-10Cを得た。

【0053】

【実施例3】

〈モノクローナル抗体MAb#117-10Cの調製と性質〉

【0054】

【実施例3-1】

〈モノクローナル抗体MAb#117-10Cの調製〉10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI-1640培地(pH7.2)に実施例2の方法により得たハイブリドーマ#117-10Cを細胞密度約 1×10^4 個/mlになるように浮遊させ、培養規模を拡大しながら5%CO₂インキュベーター中、37℃で培養した。所期の細胞密度に達した時点で、プリスタン0.5ml/匹腹腔内注射しておいたBALB/cマウスの腹腔内にハイブリドーマ#117-10Cを 1×10^7 個/匹接種し、通常の方法で1週間飼育した。

【0055】マウスから腹水を採取し、硫酸アンモニウムを60%飽和になるように加え、4℃で5時間静置した後、遠心分離し、沈澱部を採取した。この沈澱を50mM磷酸二水素カリウム溶液(pH6.8)に溶解し、新鮮な同一溶液に対して一晚透析した後、50mM磷酸二水素カリウム溶液(pH6.8)により平衡化しておいたヒドロキシアパタイトのカラムに負荷し、先ず、100mMの磷酸二水素カリウム溶液(pH6.8)を、次に、300mMの磷酸二水素カリウム溶液(pH6.8)を通液したところ、磷酸二水素カリウム濃度が300mMのときにこの発明のモノクローナル抗体MAb#117-10Cが溶出した。収量は、マウス1匹当たり約5mgであった。常法にしたがって分析したところ、モノクローナル抗体MAb#117-10CはイムノグロブリンMのクラスに属していた。

【0056】

【実施例3-2】

〈モノクローナル抗体MAb#117-10Cの性質〉

【0057】

【実施例3-2(a)】

〈IL-18R蛋白質に対する結合性〉L428細胞(FERMBP-5777)を0.1%(w/v)アジ化ナトリウムを含み、0.1%(v/v)ウシ血清アルブミンを補足したRPMI-1640培地(pH7.4)に細胞密度 4×10^4 個/mlになるように浮遊させる一方、実施例3-1の方法により得たモノクローナル抗体MAb#117-10Cを濃度0.019 μ g/ml、0.209 μ g/ml、2.3 μ g/ml、25.3 μ g/ml又は139.5 μ g/mlになるように0.1%(v/v)ウシ血清アルブミンを補足した別のRPMI-1640培地(pH7.4)に溶解した。

【0058】次に、上記で調製した細胞浮遊液を50 μ lずつとり、これに濃度の相違する上記モノクローナル抗体溶液のいずれかを50 μ lずつ加え、4℃で2時間振盪した後、常法にしたがって 125 Iにより標識したヒトIL-18を4ng含み、0.1%(v/v)ウシ血清アルブミンを補足したRPMI-1640培地(pH7.5)を50 μ lずつ加え、同じ温度でさらに30分間振盪した。その後、各細胞浮遊液にジブチルフタレート/ジオクチルフタレート混液(容量比1:1)を20

0 μlずつ加え、20℃、10,000rpmで5分間遠心分離した後、細胞を含む沈澱部を採取し、アロカ製ガンマカウンター「ARC-300型」を用いて放射能強度を測定した。

【0059】同時に、モノクローナル抗体を省略する一方、¹²⁵I標識ヒトIL-18を4ngとともに未標識ヒトIL-18を4μg加える系（非特異的結合区）と未標識ヒトIL-18を加えない系（総結合区）をそれぞれ

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{\text{総結合区} - \text{試験区}}{\text{総結合区} - \text{非特異的結合区}} \times 100$$

【0061】さらに、実施例1の方法により得たIL-18R蛋白質を含む水溶液を50μlずつとり、これに上記と同様の濃度に調整したモノクローナル抗体MAb #117-10Cを50μl加え、4℃で2時間振盪した後、¹²⁵I標識ヒトIL-18を4ngずつ加え、同じ温度でさらに30分間振盪した。その後、4mg/ml γ-グロブリンを50μl加え、氷冷下で30分間静置した後、20% (w/v) ポリエチレングリコールを含むPBSを250μl加え、氷冷下でさらに30分間静置し、4℃、6,000rpmで5分間遠心分離し、沈澱部を採取し、その放射能強度を上記と同様に測定した。

【0062】同時に、モノクローナル抗体を省略する一方、¹²⁵I標識ヒトIL-18を4ngとともに未標識ヒトIL-18を4μg加える系（非特異的結合区）と未標識ヒトIL-18を加えない系（総結合区）をそれぞれ設け、これらを試験区と同様に処置した。そして、「総結合区」及び「非特異的結合区」において観察された放射能強度と、試験区において観察された放射能強度をそれぞれ数1に示す式に代入し、阻害率(%)を計算した。結果を図1に併記する。

【0063】図1に見られるように、L428細胞を用いる場合も、溶液状のIL-18R蛋白質を用いる場合も、モノクローナル抗体MAb #117-10Cの濃度が上昇するにしたがって、IL-18のL428細胞及びIL-18R蛋白質への結合がより強く阻害された。このことは、モノクローナル抗体MAb #117-10Cが溶液中のIL-18R蛋白質及びL428細胞の表面に存在すると考えられるIL-18RにIL-18と競合して結合したことを示すと同時に、実施例1の方法により得た水溶液がIL-18を認識する性質ある蛋白質、すなわち、IL-18R蛋白質を含有し、そして、モノクローナル抗体MAb #117-10CがそのIL-18R蛋白質に特異的に反応するモノクローナル抗体であることを示している。

【0064】

【実施例3-2(b)】

〈ウェスタン・ブロッティング分析〉実施例1の方法に

*それぞれ、これらを試験区と同様に処置した。そして、「総結合区」及び「非特異的結合区」において観察された放射能強度と、試験区において観察された放射能強度をそれぞれ数1に示す式に代入し、阻害率(%)を計算した。結果を図1に示す。

【0060】

【数1】

より得たIL-18R蛋白質溶液の一部をとり、これに2.5% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム及び50% (v/v) グリセリンからなる混液を2/3容量加え、37℃で1時間インキュベートした後、常法にしたがって、還元剤非存在下においてゲル濃度10乃至20%のグラジエントSDS-PAGEを適用して蛋白質成分を分離した。常法によりゲルをニトロセルロース膜上に移し、適量の大日本製薬製固定化剤「ブロックエース」に1時間浸漬し、実施例3-1の方法により得たモノクローナル抗体MAb #117-10C、「ブロックエース」及びツイーン20をそれぞれ10μg/ml、10% (v/v) 及び0.05% (v/v) の濃度で含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に1時間浸漬した後、0.05% (v/v) ツイーン20を含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄して過剰の抗体を除いた。ニトロセルロース膜を西洋ワサビパーオキシダーゼで標識したウサギ由来の抗マウスイムノグロブリン抗体の適量と10% (v/v) ブロックエース及び0.05% (v/v) ツイーン20をそれぞれ含むトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に1時間浸漬して反応させ、0.05% (v/v) ツイーン20を含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)により洗浄した後、アマシャム製染色キット「ECL kit」を用いて発色させた。

【0065】同時に、モノクローナル抗体MAb #117-10Cを省略した系を設け、上記と同様に処置して対照とした。なお、分子量マーカーには、ウシ血清アルブミン(67,000ダルトン)、オボアルブミン(45,000ダルトン)、カルボニックアンヒドラーゼ(30,000ダルトン)、トリプシンインヒビター(20,100ダルトン)及びα-ラクトアルブミン(14,400ダルトン)を用いた。結果を図2に示す。

【0066】図2のゲル電気泳動像において、モノクローナル抗体無添加のレーン3には見られないバンドが、モノクローナル抗体添加のレーン2には観察されるが、このバンドはIL-18R蛋白質に相当するバンドである。

【0067】

【実施例3-2(c)】

〈IL-18に対する活性阻害〉ヒト急性骨髄性白血病患者に由来する株化細胞の一種であるKG-1細胞(ATCC CCL-246)を100μg/mlカナマイシンと18.8mM磷酸水素二ナトリウムをそれぞれ含み、10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI-1640培地(pH7.2)に細胞密度1×10⁷個/mlになるように浮遊させ、実施例3-1の方法により得たモノクローナル抗体MAb#117-10Cを濃度10μg/mlになるように加えた後、37℃で30分間インキュベートした。

【0068】次に、96ウェルマイクロプレートに上記KG-1細胞浮遊液を50μl/ウェルずつ分注し、それに、ヒトIL-18を上記と同一の新鮮な培地に濃度0ng/ml、1.56ng/ml、3.12ng/ml、6.25ng/ml、12.5ng/ml、25ng/ml又は50ng/mlになるように溶解したものを50μl/ウェルずつ加え、さらに、上記と同一の新鮮な培地に濃度5μg/mlになるように溶解したリボ多糖を50μl/ウェルずつ加え、37℃で24時間インキュベートした後、培養上清を採取し、そのIFN-γ含量を通常の酵素免疫アッセイにより調べた。並行して、各々のヒトIL-18濃度につき、ヒトIL-18モノクローナル抗体MAb#117-10Cを省略した系をそれぞれ設け、これらを上記と同様に処置して対照とした。結果を図3に示す。なお、図3に示すIFN-γ含量は、米国国立衛生研究所(NIH)から入手したIFN-γ標準品(Gg23-901-530)に基づき国際単位(IU)に換算して表示している。

【0069】図3に示す結果は、モノクローナル抗体MAb#117-10Cが共存すると、免疫担当細胞としてのKG-1細胞におけるIL-18によるIFN-γ産生の誘導が阻害されることを示している。このことは、モノクローナル抗体MAb#117-10CがIL-18と競合してKG-1細胞の表面に存在するIL-18Rを封鎖し、結果として、IL-18によるKG-1細胞への情報伝達を妨げたことを示している。

【0070】

【実施例3-3】

〈可変領域のアミノ酸配列と相補性決定部位の決定〉

【0071】

【実施例3-3(a)】

〈重鎖における可変領域のアミノ酸配列〉常法にしたがって、ハイブリドーマ#117-10Cを10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI-1640培地(pH7.2)に浮遊させ、培養規模を拡大しながら、37℃で増殖させた。所期の細胞密度に達した時点で増殖細胞を採取し、これを6Mグアニジンイソチオシアナート及び0.5%(w/v)ザルコシルをそれぞれ含む

10mMクエン酸ナトリウム水溶液(pH7.0)に浮遊させ、ホモジナイザーで破碎した。

【0072】次に、35ml容遠心管に5.7M塩化セシウムを含む0.1MEDTA(pH7.5)を注入し、その上部に上記で得られた細胞破砕物を重層し、この状態のまま、20℃、25,000rpmで20時間超遠心分離し、RNA画分を採取した。このRNA画分を15ml容遠心管にとり、クロロホルム/1-ブタノール混液(容量比4:1)を等容量加え、5分間振盪し、4℃、10,000rpmで10分間遠心分離した後、水層部を採取し、これにエタノールを2.5倍容加え、-20℃で2時間静置して全RNAを沈澱させた。この沈澱を採取し、75%(v/v)水性エタノールで洗浄した後、滅菌蒸留水0.5mlに溶解してハイブリドーマ#117-10C由来の全RNAを含む水溶液を得た。

【0073】斯くして得られた水溶液に1mMEDTA及び0.1%(w/v)ザルコシルをそれぞれ含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を0.5ml加え、全量を1mlとした。この混液に日本ロシュ製オリゴ(dT)30ラテックス「オリゴテックスdT30スーパー」を1ml加え、65℃で5分間反応させた後、氷浴中で急冷した。次いで、反応物に5M塩化ナトリウムを0.2ml加え、37℃で10分間インキュベートした後、25℃、10,000rpmで10分間遠心分離し、生成したベレット状の沈澱を採取し、これを滅菌蒸留水0.5mlに懸濁し、65℃で5分間インキュベートしてラテックスからmRNAを溶離させた。得られた水溶液に適量のエタノールを加え、生成した沈澱を採取し、凍結乾燥して、mRNAの固状物を得た。

【0074】0.5ml容反応管に25mM塩化マグネシウムを4μl、500mM塩化カリウムを含む100mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.3)を2μl、25mMdNTPミックスを1μl、40単位/μlのリボヌクレアーゼインヒビターを0.5μl、そして、200単位/μlの逆転写酵素を1μlそれぞれ加えた後、50μMランダムヘキサヌクレオチドの適量と上記で得られたmRNAの固状物を10ng加え、滅菌蒸留水で全量を20μlとした。得られた混合物を42℃で20分間インキュベートし、さらに、99℃で5分間インキュベートすることにより反応を終結させて第一ストランドcDNAを含む反応物を得た。

【0075】この反応物を20μlとり、これに2.5単位/μlのストラタジーン製DNAポリメラーゼ「クロードPfuポリメラーゼ」を1μl、ストラタジーン製専用緩衝液を10μl、そして、25mMdNTPミックス1μlをそれぞれ加え、さらに、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、ケイゾウ・イノウエら「ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ」、第195巻、27乃至32頁(1996年)に

記載されたPCRプライマーに基づき化学合成した5'-GGGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWYCTCTT-3'及び5'-CCCAAGCTTAGAGGGGGAAGACATTTGGGAA-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ適量加え、滅菌蒸留水で全量を100 μ lとした後、94℃で1分間、50℃で2分間、72℃で2分間この順序でインキュベートするサイクルを35回繰返してPCR反応させて、配列表における配列番号21に示す塩基配列を含むDNA断片を得た。

【0076】

【実施例3-3(b)】

〈軽鎖における可変領域のアミノ酸配列〉実施例3-3(a)の方法により得た第一ストランドDNAを含む反応物を、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、それぞれ、エス・タラン・ジョーンズら「バイオテクノロジー」、第9巻、88乃至89頁(1991年)に記載されたPCRプライマーに基づき化学合成した5'-ACTAGTCGACATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGSGTGTG-3'及び5'-GGATCCCGGGTGGATGGTGGGAA GATG-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを用いた以外は実施例3-3(a)と同様に処理して、配列表における配列番号22に示す塩基配列を含むDNA断片を得た。

【0077】

【実施例3-3(c)】

〈相補性決定部位の決定〉抗体における重鎖及び軽鎖の可変領域は、通常、4種類の枠組構造が3種類の相補性決定部位(CDR)を介して連結してなる、互いに類似した構造を有している。また、同種抗体同士の場合、一般に、枠組構造のアミノ酸配列は比較的よく保存されているのに対して、CDRのアミノ酸配列は抗体ごとに顕著な変異が見られる。そこで、実施例3-3(a)及び実施例3-3(b)で決定したアミノ酸配列と、マウス抗体についてすでに報告されている可変領域のアミノ酸配列とを比較・照合したところ、モノクローナル抗体MAb#117-10Cにおいては、重鎖における可変領域のCDRは、配列表における配列番号13(CDR1)、配列番号14(CDR2)及び配列番号15(CDR3)に示すアミノ酸配列を有し、また、軽鎖における可変領域のCDRは、配列表における配列番号16(CDR1)、配列番号17(CDR2)及び配列番号18(CDR3)に示すアミノ酸配列を有しているものと結論された。

【0078】

【実施例3-3(d)】

〈可変領域をコードする組換えDNAの構築〉重鎖における可変領域をコードする実施例3-3(a)の方法により得たDNA断片を10ngとり、これに2.5単位

／ μ lのストラタジーン製DNAポリメラーゼ「クローンドPfuポリメラーゼ」を1 μ l、ストラタジーン製専用緩衝液を10 μ l、そして、25mM dNTPミックス1 μ lをそれぞれ加え、さらに、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、それぞれ、5'-TCACTCGAGGCCACCATGAAATGCAGCTGGGTT-3'及び5'-GAGGATCCTCCTCCTCCCGATCCTCCTCCACCTGCAGAGACAGTGAC-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ適量加え、滅菌蒸留水を加えて全量を100 μ lとした。この混合物を94℃で1分間、42℃で2分間、72℃で3分間この順序でインキュベートするサイクルを3回繰返した後、さらに、94℃で1分間、60℃で2分間、72℃で3分間この順序でインキュベートするサイクルを35回繰返してPCR反応させたところ、配列表における配列番号21に示す塩基配列、その塩基配列の5'末端に連結された制限酵素XhoIによる切断部位とコザック配列、そして、3'末端に連結された制限酵素BamHIにより切断部位とリンカーの一部をコードする塩基配列からなるDNA断片を得た。

【0079】並行して、軽鎖における可変領域をコードする実施例3-3(b)の方法により得たDNA断片を10ngとり、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、それぞれ、5'-TCGGATCCGGAGGAGGAGGATCGGACATCCAGATGACTCAG-3'及び5'-GAAGCGGCCGCATCATTAGTGATGGTGTATGGTGTATGCCGTTTTTATTTCCAG-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを用いた以外は上記と同様に処理して、配列表における配列番号20に示す塩基配列、その塩基配列の5'末端に連結された制限酵素BamHIによる切断部位とリンカーの一部をコードする塩基配列、そして、3'末端に連結された制限酵素NotIによる切断部位と(His)。タグをコードする塩基配列からなるDNA断片を得た。

【0080】斯くして得られた2種類のDNA断片を制限酵素BamHI及び制限酵素NotI若しくはXhoIによりそれぞれ処理し、あらかじめ制限酵素XhoI及びNotIにより切断しておいたインビトロジェン製プラスミドベクター「pCDM8」を10ng加えた後、宝酒造製ライゲーションキット「ライゲーション・キット・バージョン2」を用いて16℃で2時間反応させてプラスミドベクター内に上記2種類のDNA断片を挿入した。次いで、常法にしたがって、このプラスミドDNAを用いてインビトロジェン製大腸菌「MC1061/P3」を形質転換する一方、得られた形質転換体「CDM/117-VL-VH」を調べたところ、形質転換体「CDM/117-VL-VH」に導入された組換えDNA「pCDM/117-VL-VH」において

は、図6に示すように、モノクローナル抗体MAb#117-10Cにおける重鎖及び軽鎖の変換領域を共にコードするcDNA「117-VL-VH cDNA」がサイトメガロウイルス・プロモーターPcmvの下流に連結されていた。

【0081】

【実施例3-3(e)】

〈形質転換体の調製とDNAの発現〉実施例3-3

(d)の方法により得た形質転換体「CDM/117-VL-VH」をアンピシリン20μg/mlとテトラサイクリン10μg/mlをそれぞれ含むLB培地(pH7.5)に接種し、37℃で18時間培養した後、培養物から菌体を取り出し、これを常法により処理してプラスミドDNAを得た。別途、アフリカミドリザルの腎臓に由来する線維芽細胞株の1種であるCOS-1細胞(ATCC CRL-1650)を常法にしたがって増殖させる一方、上記で得たプラスミドDNAを20μgとり、これを通常一般の電穿孔法により1×10⁷個のCOS-1細胞に導入して形質転換体を得た。平底培養瓶に味の素製無血清培地「ASF104」をとり、これに形質転換したCOS-1細胞を1×10⁵個/mlの割合で接種し、常法にしたがって5%CO₂インキュベーター中、37℃で4日間培養し、配列表における配列番号23に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドを発現させた。培養物から培養液を取り出し、キアジェン製アフィニティークロマトグラフィー用ゲル「Ni-NTA」のカラムに負荷し、20mMイミダゾールを含むPBSを通過して非吸着画分を除去した後、カラムに250mMイミダゾールを含むPBSを通過し、溶出液を一定量ずつ分画した。

【0082】次に、L428細胞(FERM BP-5777)を細胞密度1×10⁶個/mlになるように浮遊させた。0.1%(w/v)アジ化ナトリウムを含み、0.1%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI-1640培地(pH7.4)を50μlずつ小分けし、これに上記で得られた溶出液の画分のいずれかを50μlずつ加えた後、4℃で1時間振盪した。その後、上記と同様のRPMI-1640培地に溶解した¹²⁵I標識ヒトIL-18を4ngずつ加え、全量を150μlとし、同じ温度でさらに30分間振盪し、ジブチルフタレート/ジオクチルフタレート混液(容量比1:1)200μlに重層し、20℃、10,000rpmで5分間遠心分離した後、生じた沈澱を取り出し、その放射能強度をアロカ製ガンマカウンター「ARC-300型」を用いて測定した。その結果、発現させたポリペプチドを含む画分から生じた沈澱は、その余の画分と比較したところ、放射能強度が有意に低かった。このことは、配列表における配列番号11及び12に示すアミノ酸配列が、それぞれ、モノクローナル抗体MAb#117-10Cにおける重鎖及び軽鎖の変換領域のアミノ酸配列で

あることを裏付けている。

【0083】

【実施例4】

〈IL-18蛋白質の精製と部分アミノ酸配列〉

【0084】

【実施例4-1】

〈IL-18蛋白質の精製〉実施例3-1の方法により調製したモノクローナル抗体MAb#117-10C78mgを適量の蒸留水に溶解し、溶液を0.5M塩化ナトリウムを含む硼酸緩衝液(pH8.5)に対して4℃で16時間透析した。その後、常法にしたがって、透析内液にファルマシア製臭化シアン活性化ゲル「CNBr-アクティベーター・セファロース4B」を適量加え、穏やかに攪拌しながら4℃で18時間反応させてゲルにモノクローナル抗体MAb#117-10Cを固定化した。

【0085】次に、プラスチック製円筒管に上記のゲルをカラム状に充填し、2mM CHAPSを含むPBSにより平衡化した後、実施例1の方法により得たIL-18蛋白質を含む水溶液を負荷し、12mM CHAPSを含むPBSを通過して非吸着成分を除いた。その後、カラムに2mM CHAPS含む35mMエチルアミン(pH10.8)を通過しつつ、溶出液を8mlずつ採取し、それぞれの画分におけるIL-18蛋白質の有無を実施例1の¹²⁵I標識ヒトIL-18を用いる方法により判定した。このとき得られたクロマトグラムを図4に示す。

【0086】図4に見られるように、実施例1のIL-18蛋白質を含む水溶液のようなIL-18蛋白質と夾雑物質を含む混合物にこの発明のモノクローナル抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーを適用すると、IL-18蛋白質がシャープな単一ピークとなって溶出した。この単一ピークに相当する画分を採取し、合一し、凍結乾燥して、精製IL-18蛋白質の固状物を得た。

【0087】その後、このようにして精製したIL-18蛋白質の一部をとり、PBS中、100℃で5分間インキュベートした後、実施例3-2(a)の方法により残存活性を測定したところ、IL-18に対する結合性が全く観察されず、加熱により失活したことが判明した。このことは、この受容体の本質が蛋白質であることを裏付けている。

【0088】さらに、上記のようにして得た精製IL-18蛋白質を適量のPBSに溶解し、室温下、PBSに対して一晚透析し、実施例1の方法により¹²⁵I標識ヒトIL-18の適量とピアース製架橋試薬「BS³」を1mMそれぞれ加えた後、0℃で2時間静置してIL-18蛋白質と¹²⁵I標識ヒトIL-18との複合体を形成させた。反応物にトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を濃度50mMになるように加え、0℃でさらに1

時間静置して反応を停止させ、常法にしたがって、反応物に分子量マーカーとともに還元剤としてジチオトレイトールを用いるSDS-PAGEを適用して蛋白質成分を分離した後、オートラジオグラム分析した。

【0089】得られたオートラジオグラムにおける分子量マーカーの移動度に基づき計算したところ、このIL-18R蛋白質と¹²⁵I標識ヒトIL-18との複合体の分子量は、見掛け上、約50,000乃至200,000ダルトンであることが判明した。ヒトIL-18の分子量は約20,000ダルトンであるから、IL-18R蛋白質にヒトIL-18が1分子結合したと仮定すると、IL-18R蛋白質の分子量は、約30,000乃至180,000ダルトンということになる。

【0090】

【実施例4-2】

〈IL-18R蛋白質のペプチド・マッピング〉実施例4-1の方法により得た精製IL-18R蛋白質を、還元剤としての2% (w/v) ジチオトレイトール存在下、ゲル濃度7.5% (w/v) のSDS-PAGEによりゲル電気泳動し、ゲルを0.1% (w/v) クーマシーブリリアントブルーを含む40% (v/v) 水性メタノールと1% (v/v) 酢酸水溶液の混液に5分間浸漬して染色し、40% (v/v) 水性メタノールと1% (v/v) 酢酸水溶液の混液に2時間浸漬した後、ゲルにおける分子量約80,000乃至110,000ダルトンに相当する染色部分を切出し、0.2M炭酸アンモニウムを含む50% (v/v) 水性アセトニトリルを加え、室温下で繰返し振盪した。次いで、ゲルを真空乾燥し、0.2M炭酸アンモニウム (pH8.0) を加え、5分間静置して膨潤させた後、ブロメガ製トリプシン製剤「シーケンシング・グレード・モディファイッド・トリプシン」を0.1μg/μl含む1mM塩酸と0.2M炭酸アンモニウム (pH8.9) をそれぞれ適量加え、37℃で一晩反応させた。10% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液により反応を停止させ、反応物に0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液と60% (v/v) 水性アセトニトリルの混液を加え、室温下で振盪した後、上清を採取し、真空乾燥し、遠心濾過してペプチド断片を含む濃縮物を得た。

【0091】この濃縮物を予め0.065% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液により平衡化しておいたファルマシア製高速液体クロマトグラフィー用カラム「μRPC C2/C18 SC2.1/10」に負荷し、通液開始から160分間でアセトニトリル濃度が0% (v/v) から80% (v/v) まで直線的に上昇するアセトニトリルの濃度勾配下、80% (v/v) 水性アセトニトリルを含む0.055% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液を100μl/分の流速で通液した。波長214nmにおける溶出液の吸光度をモニターしながら溶出液を分画し、溶出開始から約45分後、約50分後、約5

5分後、約58分後、約62分後、約72分後、約75分後及び約77分後に溶出したペプチド断片をそれぞれ別々に採取した。常法にしたがって、これらのペプチド断片（以下、溶出時間の早い順に「ペプチド断片1」、「ペプチド断片2」、「ペプチド断片3」、「ペプチド断片4」、「ペプチド断片5」、「ペプチド断片6」、「ペプチド断片7」及び「ペプチド断片8」と言う。）の氨基酸配列をバーキン・エルマー製プロテイン・シーケンサー「473A型」により調べたところ、ペプチド断片1乃至8は、それぞれ、配列表における配列番号3乃至10に示す氨基酸配列を有することが判明した。このとき得られたペプチド・マップを図5に示す。

【0092】

【実施例5】

〈液剤〉安定剤として林原製結晶トレハロース粉末「トレハオース」を1% (w/v) 含む生理食塩水に実施例4の方法により得た精製IL-18R蛋白質を1mg/mlになるように溶解し、常法にしたがって精密濾過により除菌して液剤を得た。

【0093】安定性に優れた本品は、自己免疫疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための注射剤、点眼剤、点鼻剤などとして有用である。

【0094】

【実施例6】

〈乾燥注射剤〉安定剤としてシュクロースを1% (w/v) 含む生理食塩水100mlに実施例4の方法により得た精製IL-18R蛋白質を100mg溶解し、常法にしたがって精密濾過により除菌した後、バイアル瓶に1mlずつ分注し、凍結乾燥した後、密栓した。

【0095】安定性に優れた本品は、自己免疫疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための乾燥注射剤として有用である。

【0096】

【実施例7】

〈軟膏剤〉滅菌蒸留水に和光純薬工業製カルボキシビニルポリマー「ハイビスワコー104」と林原製結晶トレハロース粉末「トレハオース」をそれぞれ濃度1.4% (w/w) 及び2.0% (w/w) になるように溶解し、実施例1の方法により得たIL-18R蛋白質を均一に混合した後、pH7.2に調整して、1g当りIL-18R蛋白質を約1mg含むペースト状物を得た。

【0097】延展性と安定性に優れた本品は、自己免疫疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための軟膏剤として有用である。

【0098】

【実施例8】

〈錠剤〉林原製無水結晶α-マルトース粉末「ファイントース」に実施例4の方法により得たIL-18R蛋白質と細胞賦活剤としてのルミンを均一に混合し、得られた混合物を常法により打錠して製品1錠（約200mg

g) 当り IL-18 R 蛋白質及びビルミンをそれぞれ約 1 mg 含む錠剤を得た。

【0099】摂取性、安定性に優れ、細胞賦活作用も有する本品は、自己免疫疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための錠剤として有用である。

【0100】

【実験】

〈急性毒性試験〉常法にしたがって、8週齢のマウスに実施例5乃至8の方法により得た種々剤型の感受性疾患剤を経皮、経口又は腹腔内に注射投与した。その結果、被検試料の LD50 は、IL-18 R 蛋白質の量に換算すると、いずれの投与経路によっても約 1 mg / マウス体重以上であった。このことは、この発明の IL-18 R 蛋白質がヒトを含む哺乳類に投与する医薬品に配合して安全であることを裏付けている。

【0101】

【発明の効果】以上説明したとおり、この発明は IL-18 を認識する新規な受容体蛋白質の発見に基づくものである。この発明の IL-18 R 蛋白質は、ヒトを含む哺乳類において免疫反応を抑制したり調節する性質を有するので、臓器移植に伴う拒絶反応の緩和や、過剰な免疫反応に起因する種々の疾患の治療・予防に著効を発揮する。さらに、この発明の IL-18 R 蛋白質は IL-18 の生理作用の解明や、IL-18 R 蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマの樹立にも有用である。

【0102】この発明のモノクローナル抗体は、IL-*

配列

```

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
  1             5             10             15
Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
          20             25             30
Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
          35             40             45
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
          50             55             60
Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
          65             70             75             80
Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
          85             90             95
Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
          100            105            110
Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
          115            120            125
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
          130            135            140
Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
          145            150            155

```

【0105】配列番号：2

配列の長さ：157

* IL-18 R 蛋白質に特異的に反応するので、IL-18 R 蛋白質の精製及び検出に極めて有用である。この発明のモノクローナル抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーを IL-18 R 蛋白質と夾雑物質を含む混合物に適用するときには、高純度の IL-18 R 蛋白質が最少の時間と労力で得られ、また、この発明のモノクローナル抗体を用いる検出方法による場合には、微量の IL-18 R 蛋白質を短時間で精度良く検出することができる。さらに、この発明のモノクローナル抗体を用いる阻害剤及び阻害方法は、IL-18 が直接又は間接に関与する種々の疾患の治療や、臓器移植に伴う拒絶反応や過剰な免疫反応の抑制にも有効である。斯くも有用なモノクローナル抗体は、この発明の製造方法により、所望量を容易に製造することができる。加えて、この発明の IL-18 R 蛋白質及びモノクローナル抗体並びにそれらの断片は、IL-18 に対する作動薬や拮抗薬を検索するための試薬としても有用である。

【0103】この発明は斯くも顕著な作用効果を奏する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると言える。

【0104】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：157

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列の型：アミノ酸

50 トポロジー：直鎖状

29

30

配列の種類：ポリペプチド

配列

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
 1 5 10 15
 Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
 20 25 30
 Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
 35 40 45
 Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
 50 55 60
 Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
 65 70 75 80
 Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
 85 90 95
 Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
 100 105 110
 Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu
 115 120 125
 Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
 130 135 140
 Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
 145 150 155

【0106】配列番号：3

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Trp His Ala Ser Lys
 1 5

【0107】配列番号：4

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列

Ser Ser Gly Ser Gln Glu His Val Glu Leu Asn Pro Arg
 1 5 10

【0109】配列番号：6

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Ser Trp Tyr Lys
 1

【0110】配列番号：7

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

* 配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Ile Met Thr Pro Glu Gly Lys
 1 5

【0108】配列番号：5

配列の長さ：13

30 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

*

トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Leu Asn His Val Ala Val Glu Leu Gly Lys
 1 5 10

【0111】配列番号：8

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

50 フラグメント型：中間部フラグメント

(17)

特開平 11-100400

31

32

配列

Ser Phe Ile Leu Val Arg

1

5

【0112】配列番号：9

配列の長さ：15

配列

Thr Val Lys Pro Gly Arg Asp Glu Pro Glu Val Leu Pro Val Leu

1

5

10

15

【0113】配列番号：10

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Ser Asn Ile Val Pro Val Leu Leu Gly Pro Lys

1

5

10

【0114】配列番号：11

配列

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile

20

25

30

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Gly Pro Asn Phe

50

55

60

Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Gly Ala Gly Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

【0115】配列番号：12

配列の長さ：108

配列の型：アミノ酸

配列

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Gln Gly Lys Ser Pro Gln Ile Leu Val

35

40

45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Asn Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Tyr

* 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

*

※ 配列の長さ：119

10 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

※

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

★

(18)

特開平11-100400

33

34

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

【0116】配列番号:13

*配列の長さ:18

配列の長さ:10

配列の型:アミノ酸

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ポリペプチド

配列の種類:ポリペプチド

フラグメント型:中間部フラグメント

フラグメント型:中間部フラグメント

配列

10

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile Tyr Ile Tyr

1

5

10

【0117】配列番号:14

*

配列

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Gly Pro Asn Phe Gln

1

5

10

15

Asp Lys

【0118】配列番号:15

※

配列

配列の長さ:10

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp

配列の型:アミノ酸

20

1

5

トポロジー:直鎖状

【0121】配列番号:18

配列の種類:ポリペプチド

配列の長さ:9

フラグメント型:中間部フラグメント

トポロジー:直鎖状

配列

配列の種類:ポリペプチド

Arg Gly Asn Tyr Gly Ala Gly Phe Gly Tyr

1

5

10

フラグメント型:中間部フラグメント

配列

【0119】配列番号:16

Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Tyr Thr

配列の長さ:11

1

5

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ポリペプチド

フラグメント型:中間部フラグメント

配列

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala

1

5

10

【0120】配列番号:17

配列の長さ:7

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ポリペプチド

フラグメント型:中間部フラグメント

※

【0122】配列番号:19

30

配列の長さ:357

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号:mat peptide

存在位置:1..357

特徴を決定した方法:E

配列

GAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GCG GCA GAG CTT GTG AAG CCA GCG GCC

48

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

TCA GTC AAA TTG TCC TGC ACA ACT TCT GCG TTC AAC ATC AAA GAC ATA

96

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile

20

25

30

TAT ATC TAC TCG GTG AAA CAG ACG CCT GAA CAG GCG CTG GAG TCG GTT

144

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Val

特開平 11-100400

【0123】配列番号：20

* 配列の種類：cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号: mat peptide

20 存在位置：1..324

トポロジー：直鎖状

* 特徴を決定した方法：E

配列

【0124】配列番号：21

特徴を表す記号: sig peptide

存在位置：1..57

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号: mat peptide

トポロジー：直鎖状

存在位置：58..414

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：E

配列の特徴

50

37	38
配列	
ATG AAA TGC AGC TGG GTT TTT CTC TTC CTG ATG GCA GTG GTT ACA GCG	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
GTC AAT TCA GAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GCG GCA GAG CTT GTG AAG	96
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys	
1 5 10	
CCA GGG GCC TCA GTC AAA TTG TCC TGC ACA ACT TCT GCG TTC AAC ATC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
AAA GAC ATA TAT ATC TAC TGG GTG AAA CAG AGG CCT GAA CAG GCG CTG	192
Lys Asp Ile Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG GTT GGA AGG ATT GAT CCT GCG AAT GGT GAT ACT AAA TAT GCG	240
Glu Trp Val Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Gly	
50 55 60	
CCG AAT TTC CAG GAC AAG GCC ACT ATA ACA GCA GAC ACA TCC TCC AAC	288
Pro Asn Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn	
65 70 75	
ACA GCC TAC CTG CAG CTT CGT AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACT GCC GTC	336
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCT AGA CCG GGT AAC TAC GCG GCG TTT GGT TAC TGG	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Gly Ala Gly Phe Gly Tyr Trp	
95 100 105	
GCG CAA GCG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA	414
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
110 115	

【0125】配列番号：22

配列の長さ：384

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の特徴

* 特徴を表す記号：sig peptide

30 存在位置：1..60

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：61..384

特徴を決定した方法：E

*

配列	
ATG AGT GTG CTC ACT CAG GTC CTG GCG TTG CTG CTG CTG TGG CTT ACA	48
Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr	
-20 -15 -10 -5	
GCT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG ACT CAG TCT CCA GCC TCC CTT TCT	96
Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser	
1 5 10	
GCA TCT GTG GGA GAA ACT GTC ACC ATC ACA TGT CGA CCA AGT GCG AAT	144
Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn	
15 20 25	
ATT CAC AAT TAT TTA GCA TGG TAT CAG CAG AGA CAG GGA AAA TCT CCT	192
Ile His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Gln Gly Lys Ser Pro	
30 35 40	
CAG ATC CTG GTC TAT AAT GCA AAA ACC TTA GCA GAT GGT GTG TCA TCA	240
Gln Ile Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Ser Ser	

(21)

特開平 11-100400

39 40
 45 50 55 60
 AGG TTG AGT GGC AGT GGA TCA CGA ACA CAA TAC TCT CTC AAT ATC AAC 288
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Asn Ile Asn
 65 70 75
 AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCG ACT TAT TTC TGT CAA CAT TTT TGG 336
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Trp
 80 85 90
 AGT ACT CCG TAC ACG TTC GGA GCG GCG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CCG 384
 Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 95 100 105

【0126】配列番号：23

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：248

配列の種類：ポリペプチド

配列の型：アミノ酸

*

配列

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile
 20 25 30
 Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Gly Pro Asn Phe
 50 55 60
 Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Gly Ala Gly Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser
 130 135 140
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Gln Gly Lys
 165 170 175
 Ser Pro Gln Ile Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val
 180 185 190
 Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Asn
 195 200 205
 Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Phe Cys Gln His
 210 215 220
 Phe Trp Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 225 230 235 240
 Lys Arg His His His His His
 245

R蛋白質に結合する様子を示す図である。

【図面の簡単な説明】

【図1】モノクローナル抗体MA b # 117-10C

【図2】モノクローナル抗体MA b # 117-10Cを用いるウェスタン・ブロッティング法により可視化し

が、IL-18と競合してL428細胞及びIL-18

50 た、この発明のIL-18 R蛋白質のゲル電気泳動のデ

イスプレー上に表示した中間調画像である。

【図3】IL-18R蛋白質によるIL-18の活性阻害を示す図である。

【図4】IL-18R蛋白質にモノクローナル抗体MAb #117-10Cを用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーを適用したときのクロマトグラムである。

【図5】IL-18R蛋白質のペプチド・マップである。

*

*【図6】組換えDNA「pCDM/117-VL-VH」の構造を示す図である。

【符合の説明】

pCDM/117-VL-VH cDNA

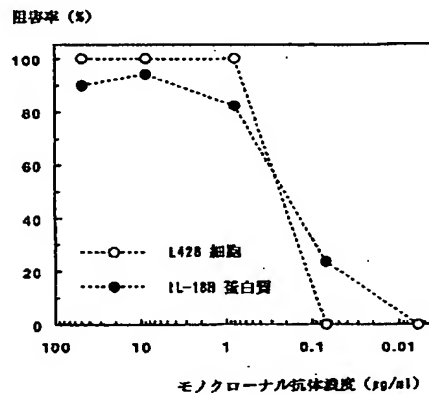
モノクローナル抗体MAb #117-10Cにおける重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするcDNA

Pcmv

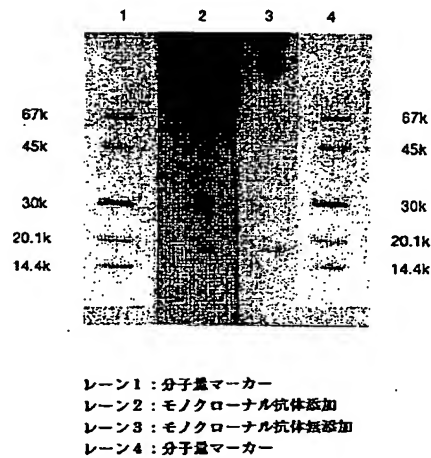
サイトメガロウイルスプロモーター

ルスプロモーター

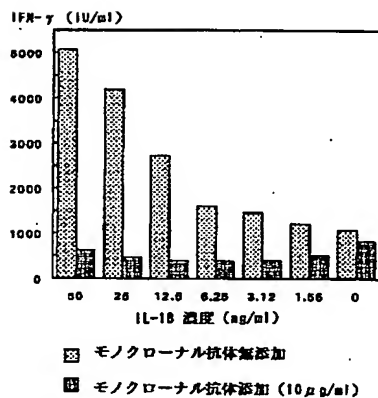
【図1】



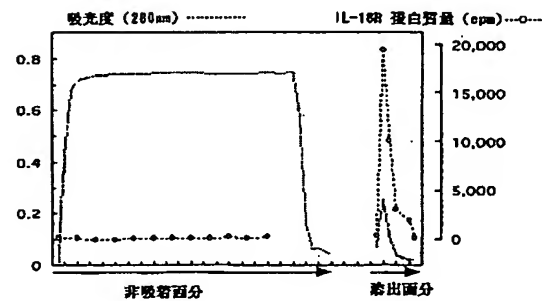
【図2】



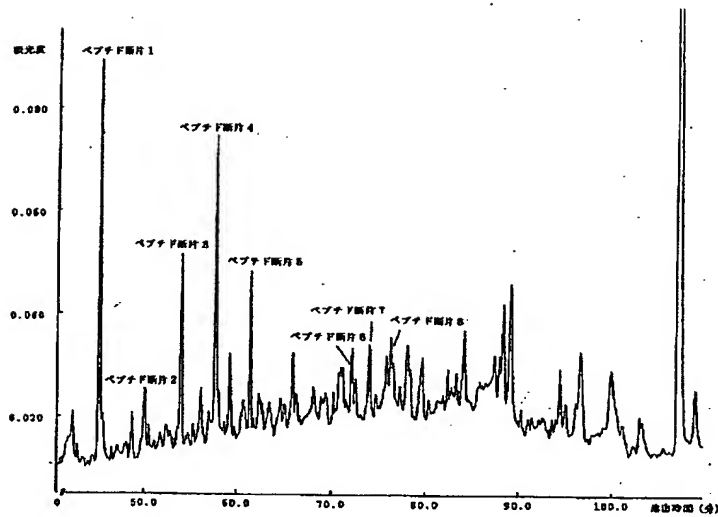
【図3】



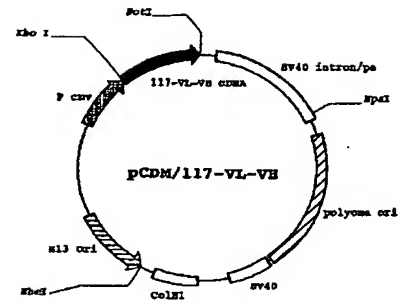
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/08	Z N A		P
G 0 1 N 33/53		33/577	B
		C 0 7 K 14/54	
		A 6 1 K 37/02	A B B
// C 0 7 K 14/54		C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 N 15/02		15/00	C
(C 1 2 N 5/10			
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:91)			

(31)優先権主張番号 特願平9-215490
 (32)優先日 平9(1997)7月28日
 (33)優先権主張国 日本(J P)